

PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12N 9/02, C12P 7/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/18138</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. September 1993 (16.09.93)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE93/00198</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 5. März 1993 (05.03.93)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 42 07 921.7 13. März 1992 (13.03.92) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Wilhelm-Johnen-Straße, D-5170 Jülich (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : KULA, Maria-Regina [DE/DE]; Selgenbusch 12, D-5162 Niederzier (DE). PEETERS, Jörg [DE/DE]; Albrecht-Dürer-Straße 45, D-4006 Erkrath 1 (DE).</p>	<p>(74) Gemeinsamer Vertreter: FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH; Rechts- und Patentabteilung, Postfach 1913, D-5170 Jülich (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Title: NEW KETONIC ESTER REDUCTASES, ITS PREPARATION AND USE FOR ENZYMATIC REDOX REACTIONS</p> <p>(54) Bezeichnung: NEUE KETOESTER-REDUKTASE, DEREN HERSTELLUNG UND VERWENDUNG FÜR ENZYMATISCHE REDOXREAKTIONEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>An enzyme designated as ketonic ester reductase capable of being used in the NADH-dependent enzymatic reaction of β, γ and δ ketonic acid esters into the corresponding optically active β, γ and δ hydroxycarboxylic acid esters can be isolated from strains of <i>Candida parapsilosis</i>, <i>Yarrowinia cellobiosa</i>, <i>Rhodococcus erythropolis</i> or <i>Pseudomonas acidovorans</i>, preferably cultivated on a long-chain alkane and/or alkane acid-containing culture medium, appropriately in the presence of an inductor. An usable enzyme preparation can be recovered by fractionated PEG-precipitation from the cell raw extract; high specific activities (for example 1855 U/mg) may then be obtained by chromatographic purification. The enzyme is characterized by a wide substrate spectrum. Not only (possibly substituted) so-called ketonic esters are accepted, but also a number of other oxo-compounds, among which diketones, (possibly substituted, in particular halogenated) aliphatic, alicyclic and aromatic ketones, as well as ketoacetals and aldehydes. The S-enantiomer-forming reduction is supplemented by the possibility to recover R-enantiomers from racemates by oxidizing the S-enantiomer and separating the oxo-compound.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Aus Stämmen von <i>Candida parapsilosis</i>, <i>Yarrowinia cellobiosa</i>, <i>Rhodococcus erythropolis</i> oder <i>Pseudomonas acidovorans</i> ist ein als Ketoester-Reduktase bezeichnetes Enzym isolierbar, das zur NADH-abhängigen enzymatischen Umsetzung von β-, γ- und δ-Ketocarbonsäureestern zu den entsprechenden optisch aktiven β-, γ- und δ-Hydroxycarbonsäureestern befähigt ist. Die Kultivierung erfolgt vorzugsweise auf einem längerkettige Alkane und/oder Alkansäuren enthaltenden Nährmedium, zweckmäßigerweise in Gegenwart eines Induktors. Aus dem Zellrohextrakt kann ein brauchbares Enzympräparat durch fraktionierte PEG-Fällung gewonnen werden; durch anschließende chromatographische Aufreinigung können hohe spezifische Aktivitäten (z.B. 1855 U/mg) erzielt werden. Das Enzym zeichnet sich durch ein breites Substratspektrum aus: so werden nicht nur die genannten (ggf. substituierten) Ketoester akzeptiert, sondern eine Vielzahl weiterer Oxo-Verbindungen, zu denen Diketone, (ggf. substituierte, insb. halogenierte) aliphatische, alicyclische und aromatische Ketone sowie Ketoacetale und Aldehyde gehören. Die Reduktion unter Bildung von S-Enantiomeren wird durch die Möglichkeit zur Gewinnung von R-Enantiomeren aus Racematen durch Oxidation des S-Enantiomeren und Abtrennung der Oxo-Verbindung ergänzt.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	PL	Polen
BJ	Benin	IE	Irland	PT	Portugal
BR	Brasilien	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SK	Slowakischen Republik
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechischen Republik	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam
FI	Finnland				

B e s c h r e i b u n g

Neue Ketoester-Reduktase, deren Herstellung und Verwendung für enzymatische Redoxreaktionen

Gegenstand der Erfindung ist eine neue zur NADH-abhängigen enzymatischen Umsetzung von β -, γ - und δ -Ketoestern zu den entsprechenden optisch aktiven β -, γ - und δ -Hydroxysäureestern befähigte Ketoester-Reduktase, die aus Stämmen von *Candida parapsilosis*, *Yarrowinia cellobiosa*, *Rhodococcus erythropolis* oder *Pseudomonas acidovorans* isolierbar ist.

Optisch aktive β -, γ - und δ -Hydroxycarbonsäureester sind wertvolle chirale Synthesebausteine, die eine breite Anwendung in der Synthese von Pharmaka, Aromastoffen, Pheromonen, Agrochemikalien und Enzym-Inhibitoren finden. Sie sind auf konventionellem chemischem Wege nur schwer zugänglich, da die Trennung des durch chemische Reduktion entstehenden Enantiomerengemisches aufwendig und kostenintensiv ist.

Bekannt sind Arbeiten zur fermentativen Herstellung von β -, γ - und δ -Hydroxycarbonsäuren und -estern mit Hilfe von Mikroorganismen. Dabei werden die mikrobiellen Zellen stets im Überschuß eingesetzt und die Ausbeute und Enantiomerenüberschüsse variieren je nach Herkunft der Zellen über einen weiten Bereich. Am häufigsten wird dabei die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt.

Bekannt sind auch bereits aus *Saccharomyces cerevisiae* isolierte Oxidoreduktasen, welche die enzymatische Reduktion der β -, γ - und δ -Ketogruppe von entsprechenden Ketoestern unter Bildung der entsprechenden optisch aktiven Hydroxyverbindungen katalysieren (Heidlas et al. (1988) Eur. J. Biochem. 172: 633-639). Diese bekannten Oxidoreduktasen benötigen NADPH als Cokatalysator, dessen Regenerierung diffizil ist, weshalb die gewerbliche Akzeptanz dieses an sich bekannten enzymatischen Syntheseweges nicht ohne weiteres gegeben ist.

Ziel der Erfindung war daher eine durch NADH kokatalysierte enzymatische Umsetzung von β -, γ - und δ -Ketoestern sowie ein dafür geeignetes Enzym.

Dieses wurde überraschenderweise in bestimmten Hefen und Bakterien gefunden, und zwar in *Candida parapsilosis* und *Yarrowinia cellobiosa* sowie in *Rhodococcus erythropolis* und *Pseudomonas acidovorans*, die in der Lage sind *n*-Alkane bzw. *n*-Alkansäure zu verwerten. Die aus *Candida parapsilosis* und *Rhodococcus erythropolis* isolierte Ketoester-Reduktase wurde umfangreich untersucht.

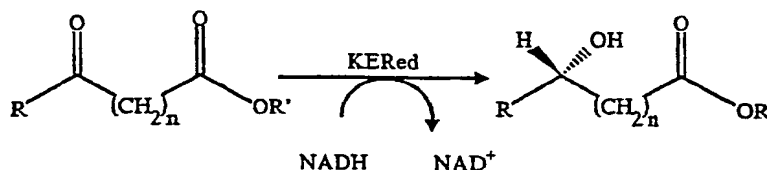
Besonders hohe Aktivitäten der neuen Ketoester-Reduktase (KERed) wurden erzielt, wenn *Candida parapsilosis* bzw. *Rhodococcus erythropolis* auf einem Nährmedium gezüchtet wurden, das längerkettige Alkansäuren bzw. Alkane, und zwar insbesondere Dodekansäure und Tetradecan, als Kohlenstoff-Quelle enthielt.

Besonders intensiv wurde die Bildung der KERed mittels *Candida parapsilosis* DSM 70 125 und die Isolierung und Aufreinigung des Enzyms aus diesem Stamm untersucht.

Die gereinigte KERed zeichnet sich durch folgende Parameter aus :

- ein pH-Optimum für die Ketoester-Reduktion zwischen pH 7,8 und 8,0 und für die Rückreaktion um pH 9,5.
- ein Temperatur-Optimum für die Ketoester-Reduktion zwischen 36°C und 40°C und für die Rückreaktion von 50°C bis 56°C.
- rasche Desaktivierung durch Hg^{2+} -, Pb^{2+} -, Ag^{+} -, Cu^{2+} -, Ni^{2+} -, Sn^{2+} - und Co^{2+} -Ionen. Starke Inhibierung durch p-Hydroxymercuribenzoat, 5.5'Dithio-Bis(2-Nitrobenzoat) und Jodacetamid sowie durch die Chelatoren 2.2'-Bipyridyl und o-Phenanthrolin. Stabilisierung durch SH-Schutzreagenzien wie Dithiothreitol.
- zusätzliche Befähigung zur Reduktion von aliphatischen, alicyclischen und aromatischen Ketonen, Diketonen, Ketalen und Aldehyden sowie zur Oxidation von primären und sekundären Alkoholen

Die reduktive enzymatische Umsetzung von β -, γ - und δ -Ketoestern zu den entsprechenden optisch aktiven Hydroxycarbonsäureestern erfolgt nach folgender Gleichung :



R und R' können Reste breiter Vielfalt sein wie aus Tabelle 4 hervorgeht. n kann Werte zwischen 1 und 3 annehmen. Darüberhinaus skizziert das Modell der Substratbindungsstelle (Fig. 5, Tabelle 5, Beispiel 3.G) die Grenzen der Substratakzeptanz.

Neben den Ketoestern werden von der KERed weitere Oxoverbindungen als Substrate akzeptiert, wie insbesondere 1,1-Dichloraceton, Chloraceton, 3-Chlor-2-Butanon, 2-Octanon, 2-Butanon, 2-Pentanon, 2-Methyl-3-Pentanon, Methoxy-2-Propanon, Acetophenon, 3-Chloracetophenon, 4-Fluoracetophenon, 4-Bromacetophenon, Propiophenon, 2,4-Hexandion, 2,4-Pentandion sowie Acetaldehyd, Isobutyraldehyd und Propionaldehyd. Acetophenon wird zu (*S*)-Phenylethanol, 3-Oxobuttersäureethylester zu (*S*)-3-Hydroxybuttersäureethylester und 5-Oxohexansäureethylester zu (*S*)-5-Hydroxyhexansäureethylester umgesetzt.

Interessant ist in diesem Zusammenhang speziell die Möglichkeit der Umsetzung von Acetophenon, 4-Bromacetophenon, 3-Chloracetophenon und 4-Fluoracetophenon zu den entsprechenden (*S*)-Phenylethanol in NADH-Cokatalyse, da bislang nur die (*R*)-spezifische Umsetzung realisiert ist.

Die Rückreaktion (Oxidation der Hydroxygruppe) ist ebenso enzymatisch durchführbar und kann insbesondere dazu ausgenutzt werden, durch Umsetzung des *S*-Enantiomeren eines Racemats von *R*- und *S*-Hydroxyverbindungen das ggf. gewünschte *R*-Enantiomere zu gewinnen.

Die nachstehend im einzelnen beschriebene Ketoester-Reduktase ist, wie dargelegt, nicht nur zur Reduktion der β -, γ -, δ -Ketogruppen der Ketoester befähigt, sondern darüberhinaus zur Reduktion einer breiten Vielfalt von Carbonylverbindungen verwendbar. Daher kann das Enzym auch als Carbonyl-Reduktase bezeichnet werden.

Das neue Enzym kann innerhalb der EC-Klassifizierung unter der Nummer [EC 1.2.1] eingeordnet werden. Eine genaue Zuweisung einer EC-Nummer steht bisher allerdings noch aus. Der Einfachheit halber wird das neue Enzym in der anschließenden Beschreibung als Ketoester-Reduktase (KERed) bezeichnet.

Man erhält die KERed in an sich bekannter Weise durch Kultivierung (in üblichen Nährmedien ggf. in Gegenwart von Alkanen und/oder Alkansäuren) der genannten Mikroorganismen, aus deren Rohextrakt ein verwendbares Enzympräparat durch fraktionierte PEG-Fällung erhalten werden kann, bei der zunächst mit relativ niedermolekularem Polyethylenglycol (PEG) für die Ausfällung von Begleitproteinen gesorgt wird, während die KERed noch in Lösung bleibt, die dann aus der Flüssigkeit durch PEG mit erhöhtem Molekulargewicht ausgefällt und aus dem Niederschlag durch Pufferlösung wieder "extrahiert" wird.

Alternativ kann mit unterschiedlichen PEG-Konzentrationen aber gleichbleibendem Molekulargewicht im Bereich von 1.000 bis 10.000, insbesondere um 5.000, gearbeitet werden. Eine weitere Reinigung durch chromatographische Trennmethode führt zu bevorzugten Isolaten mit höherer spezifischer Aktivität wie anhand des nachfolgend wiedergegebenen Beispiels dargelegt wird.

Im Folgenden wird die Erfindung mehr im einzelnen anhand von Beispielen beschrieben. Dabei wird auf die angefügten Zeichnungen Bezug genommen. Es zeigen :

- Figur 1 und 2 die Bildung der KERed mittels *C. parapsilosis* bei Wachstum auf Glycerin (1) bzw. Dodecansäure (2)
- Figur 3 die Regulation der Aktivität der KERed aus *C. parapsilosis*
a) 5.4% Glucose, b) 0.8% Glucose, c) 2% Glycerin, d) 2% Glycerin + 0.1% Induktor, e) 1% Dodecansäure, f) 1% Dodecansäure + 0.1% Induktor; Induktor : 3-Oxohexansäureethylester
- Figur 4 die pH-Abhängigkeit der KERed-Aktivität bei Oxidation und Reduktion
- Figur 5 Modell der Substratbindungsstelle der KERed aus *C. parapsilosis*
- Figur 6 die chromatographische Trennung von (R)- und (S)-3-Hydroxybuttersäuremethylester und zwar (a) für das racemische Gemisch und (b) für das erfindungsgemäße KERed-Umsetzungsprodukt
- Figur 7 die chromatographische Trennung von (R)- und (S)-5-Hydroxybuttersäureethylester für das erfindungsgemäße KERed-Umsetzungsprodukt

Beispiel 1 : Gewinnung des Enzyms

1. Screening

Sammlungsstämmen der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) wurden in dem von der DSM empfohlenen Medium angezogen, die Zellmasse durch Zentrifugation geerntet und durch Naßvermahlung aufgeschlossen. Der Überstand diente als Enzymquelle (Rohextrakt) und wurde auf Ketoester-Reduktase-Aktivität untersucht. Der Test wurde photometrisch durchgeführt, wobei der Testansatz folgende Komponenten enthielt :

- 0,2 mM NAD(P)H
- 8 mM Ketoester
- 0,1 M Triethanolamin (TEA)-NaOH-Puffer, pH 7
- limitierende Mengen an Rohextrakt

Es wurde die NAD(P)H-Abnahme bei 334 nm über einen Zeitraum von 1 Minute verfolgt. Zur Aktivitätsberechnung wurde ein Absorptionskoeffizient von $6,18 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ verwendet. Tabelle 1 faßt die erhaltenen spezifischen Aktivitäten für die einzelnen Mikroorganismen zusammen, die sich aus einer Gruppe von 65 getesteten Mikroorganismen als tauglich erwiesen haben.

Pro Mikroorganismus ist in der ersten Zeile die NADH-abhängige, in der zweiten Zeile die NADPH-abhängige spezifische Aktivität in mU/mg angegeben. Ein U (Unit) entspricht einem Umsatz von 1 μmol reduziertem Coenzym pro Minute.

Tabelle 1

KERed aus :	AEEE ¹⁾	BEEE	ABS	ABEE	LS	LSEE
mU/mg						
<i>P. acidovorans</i>	49.0	11.6	9.1	15.9	2)	4.1
-	-	15.6	3.5	-	-	-
<i>R. erythropolis</i>	153.0	3.0	n.b. ³⁾	97.0	n.b.	87.1
-	-	-	n.b.	-	n.b.	-
<i>C. parapsilosis</i>	91.0	49.0	16.4	96.1	2.7	85.1
-	14.1	25.0	25.0	4.5	2.4	1.3
<i>Y. cellobiosa</i>	103.1	20.3	n.b.	55.4	n.b.	41.1
-	5.0	-	n.b.	-	n.b.	4.0

¹⁾AEEE: Acetessigsäureethylester ; BEEE: Butyrylessigsäureethylester ; ABS: Acetylbuttersäure ; ABEE: Acetylbuttersäureethylester ; LS: Laevulinsäure ; LSEE: Laevulinsäureethylester ; ²⁾-: Aktivität unter der Nachweisgrenze ; ³⁾n.b.: nicht bestimmt

2. Züchtung von *Candida parapsilosis*

Zur Enzymgewinnung wurde *Candida parapsilosis* in folgendem Medium angezogen (pro 1 l) :

Hefeextrakt	10 g	
Kaliumphosphat	1 g	
Ammoniumsulfat	1.2 g	
Glycerin	20 g	(nicht reprimiert)
oder Glucose	54 g	(reprimiert)
oder Glucose	8 g	(dereprimiert)
oder Dodecansäure	10 g	
ggf. 0,1%iger Zusatz von 3-Oxohexansäureethylester (Induktor)		

Der pH-Wert dieser Lösung wurde auf 4,5 eingestellt, dann wurde für 15 min bei 121°C (2 bar) sterilisiert. Der Organismus wurde aerob kultiviert. Im 10 l-Maßstab wurde das Medium nach Erreichen der Bruttemperatur von 30°C mit 400 ml einer 20 Std. alten Vorkultur beimpft. In einem solchen 10 l-Ansatz wurde beispielhaft der Verlauf der Enzymaktivität über der Zeit bestimmt, indem Proben zu verschiedenen Zeiten entnommen wurden und die Aktivität der Ketoester-Reduktase nach Aufschluß der Zellen bestimmt wurde. In Fig. 1 ist ein solcher Verlauf dargestellt, die Aktivität der Ketoester-Reduktase erreicht nach 20 Std. einen maximalen Wert und fällt anschließend wieder ab. Die Zellernte erfolgte nach 20 Stunden durch Zentrifugation, wobei aus 8 l Medium 175 g Feuchtmasse erhalten wurden. Die Zellmasse kann bei -20 °C eingefroren gelagert werden, wobei über mehrere Wochen kein Aktivitätsverlust erkennbar ist.

3. Enzymisolierung (Rohextrakt)

Die Enzymfreisetzung aus den ganzen Zellen kann durch an sich bekannte Methoden (Ultraschall, Hochdruck-Homogenisation, Naßvermahlung u.a.) geschehen. Hier wurden die Zellen durch Naßvermahlung mit Glasperlen aufgeschlossen. Dazu wurde die Zellmasse (175 g) in Aufschlußpuffer (200 mM TEA-NaOH-Puffer (pH 7,5) unter Zusatz von 5 mM Dithiothreitol und 1 mM Protease-Inhibitor (Pefabloc, Fa. Merck, Darmstadt) suspendiert, so daß die Konzentration der Zellfeuchtmasse 25%ig war (700 ml Endvolumen).

Die Zellinhaltsstoffe wurden aus der gekühlten Suspension (4°C) durch einen mechanischen Aufschluß mit Hilfe einer Glasperlenmühle (Desintegrator S, Fa. IMA, Frankfurt) freigesetzt. Der Mahlbehälter wurde dazu mit Glasperlen (0,5 mm : 0,3 mm = 2 : 1 - Verhältnis, 90 ml) gefüllt und mit 60 ml der 25%igen Zellsuspension aufgefüllt. Der Aufschluß wurde bei einer Rührwellendrehzahl von 4000 UpM durchgeführt. Der Kühlmantel wurde während des Laufs gekühlt. Eine Aufschlußzeit von 9 min erwies sich als optimal und wurde für den Zellaufschluß verwendet. Nach dem Zellaufschluß wurde der Überstand dekantiert und die Glasperlen zweimal mit Aufschlußpuffer gewaschen.

175 g Hefefeuchtmasse ergaben 285 ml Rohextrakt mit einer Volumenaktivität von 6,6 U/ml und einem Proteingehalt von 10,7 mg/ml. Hieraus läßt sich errechnen, daß aus 100 l Fermenteransatz ca. 23 000 Einheiten Ketoester-Reduktase gewonnen werden können (1 Enzymeinheit ist die Enzymmenge, die 1 µmol Acetylbuttersäureethylester pro Minute umsetzt).

4. Anreicherung des Enzyms

Das Enzym kann durch an sich bekannte Methoden der Proteinreinigung wie zweistufige, fraktionierte Polyethylenglycol-Fällung, Ionenaustausch-Chromatographie und Affinitätschromatographie angereichert und gereinigt werden.

4.1 Fraktionierte Polyethylenglycol-Fällung

Eisgekühlter Rohextrakt (4°C) wird unter Rühren und pH-Kontrolle (pH 7-7,5) mit Polyethylenglycol (M_w : 5000) bis zu einer Konzentration von 4% (w/v) versetzt. Nach Zentrifugieren bei 10 000 UpM für 10 min wird der Überstand weiter mit PEG₅₀₀₀ bis zu einer Endkonzentration von 30% versetzt. Das nach Zentrifugation bei 10 000 UpM für 15 min erhaltene Sediment enthält die Ketoester-Reduktase-Aktivität und kann in Triethanolamin-NaOH-Puffer, 20 mM, pH 7,5 aufgenommen und lyophilisiert werden. Das Enzym ist unter diesen Bedingungen mehrere Monate ohne Aktivitätsverlust haltbar.

4.2 Ionenaustausch-Chromatographie

1 ml resuspendiertes Sediment aus der 30%igen PEG-Fällung (entspr. Beisp. 1; 4.1) wird auf eine Q-Sepharose-FastFlow-Säule (Anionen-Austauscher, HiLoad, High Performance, 16/10, 20 ml Gelvolumen) aufgetragen (FPLC-Chromatographie-System der Fa. Pharmacia, Freiburg). Die Säule ist mit Puffer A äquilibriert worden (20 mM Triethanolamin-NaOH-Puffer; pH 7,5). Nach ausgiebigem Waschen der Säule mit Puffer A wird die Ketoester-Reduktase mit einem linearen NaCl-Gradienten (0-200 mM) eluiert, wobei das Enzym bei ca. 100 mM NaCl eluiert. Die Chromatographie wurde bei einer Flußrate von 1 ml/min durchgeführt. Die erzielte Anreicherung ist in Tab. 2 zusammengefaßt.

4.3 Affinitätschromatographie

Die Fraktionen der Q-Sepharose-Chromatographie mit der höchsten Aktivität werden gesammelt, mit Hilfe einer Ultrafiltrationszelle (Amicon, Witten/Ruhr) aufkonzentriert und weiter aufgereinigt durch Chromatographie an Agarose-NAD (Fa. Sigma, Deisenhofen). Es wurde das Niederdruck-Chromatographie-System der Fa. Pharmacia verwendet. Das Gelbett betrug 5 ml. Die Chromatographie wurde mit einer Flußrate von 0,5 ml/min durchgeführt. Die Anreicherung ist in Tab. 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2 : Anreicherung der Ketoester-Reduktase

Reinigungsschritt	Spez.-Aktivität (U/mg)	Gesamt-Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Rohextrakt	0,6	100	1,0
4% PEG-Fällung	0,7	75	1,2
30% PEG-Fällung	2,5	75	4,2
Q-Sepharose FF	40,3	71	67,0
Ultrafiltration	40,3	67	67,0
Agarose-NAD ⁺	1855,0	67	3091,0

Das scheinbare native Molekulargewicht der Ketoester-Reduktase von 136 kDa (\pm 11 kDa) wurde durch Gelpermeations-Chromatographie an Sephadex G-200 bestimmt. Dabei dienten Thyroglobulin, Ferritin, Katalase, Aldolase, Rinderserumalbumin, Ovalbumin, Chymotrypsinogen A und Ribonuclease A als Eichproteine. Die beiden gleich großen Untereinheiten haben ein scheinbares Molekulargewicht von 67 kDa, wie durch SDS-Gelelektrophorese bestimmt wurde. Als Molekulargewichtsstandard wurde eine Mischung aus α_2 -Makroglobulin, Phosphorylase b, Rinderserumalbumin, Glutamat-Dehydrogenase, Lactat-Dehydrogenase und Trypsininhibitor verwendet.

Je nach unterschiedlicher Herkunft der KERed sind gewisse Abweichungen im Molekulargewicht bei gleichbleibender Funktion (NADH-abhängige Reduktion von β -, γ - und δ -Ketoestern) zu erwarten.

Beispiel 2 : Regulation der Ketoester-Reduktase

Die Regulation der Ketoester-Reduktase wurde untersucht. Dazu wurden Zellen auf unterschiedlichen C-Quellen (s. dazu Beispiel 1; 2) im 200 ml-Maßstab angezogen. Der Zeitpunkt, bei dem die Aktivität der Ketosäure-Reduktase maximal ist, wurde ermittelt und als Erntezeitpunkt festgelegt (s. Fig. 1).

Die spezifische Aktivität der Ketoester-Reduktase für 5-Oxohexansäureethylester ist in Figur 3 in Abhängigkeit vom Wachstum auf unterschiedlichen C-Quellen dargestellt. Die Ketoester-Reduktase von *Candida parapsilosis* unterliegt der Katabolit-Repression. Unter dereprimierenden Bedingungen (0,8% Glucose im Medium) liegt die spezifische Aktivität des Enzyms etwa 36% höher, als unter reprimierenden Bedingungen (5,4% Glucose im Medium). Unter nicht-reprimierenden Bedingungen (2% Glycerin im Medium) ist die spezifische Aktivität etwa 300% höher, als unter reprimierenden Bedingungen. Bei Wachstum auf Dodecansäure wird die Aktivität der Ketoester-Reduktase von *Candida parapsilosis* auf über 700% gesteigert. Der Zusatz eines Ketoesters zum Medium (0,1%) bringt im Fall von Glycerin als C-Quelle eine Steigerung der spezifischen Aktivität auf 350%.

Beispiel 3 : Charakterisierung der Ketoester-Reduktase

Für die folgenden Versuche wurde partiell gereinigtes Enzym (nach Q-Sepharose-Chromatographie, 67-fache Anreicherung) eingesetzt.

A. pH-Abhängigkeit der Umsetzung

Die Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert wurde bestimmt, indem 5-Oxohexansäureethylester (35 mM) mit NADH (0,2 mM) und 10 ml Enzymlösung bei unterschiedlichen pH-Werten (0,2 M Pufferlösung) gemischt wurden und die Aktivität bei 340 nm (30°C) photometrisch verfolgt wurde. Fig. 4 zeigt die erhaltenen Aktivitätswerte in Abhängigkeit vom pH-Wert, das Optimum für die 5-Oxohexansäureethylester-Reduktion liegt bei pH 7,9

In analoger Weise wurde das pH-Optimum für die Rückreaktion, die 5-Hydroxyhexansäureethylester-Oxidation, gemessen. (R/S)-5-Hydroxyhexansäureethylester (35 mM) wurde in 0,2 M Puffer mit pH-Werten zwischen 4 und 10 gelöst, 0,2 mM NADH und 10 µl Enzymlösung zugesetzt und die NADH-Bildungsrate photometrisch bei 340 nm verfolgt. Fig. 4 faßt die erhaltenen Werte zusammen, das pH-Optimum für die Oxidation liegt bei pH 9,5.

B. Temperaturabhängigkeit der Reduktion

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums der Reduktion wurde die Enzymaktivität zwischen 30 und 60°C gemessen. Der Testansatz enthielt :

5-Oxohexansäureethylester	35 mM
NADH	0,2 mM
Enzymlösung	10 µl
TEA-NaOH-Puffer, 0,1 M; pH 7,9	

Die KERed aus *C. parapsilosis* hat ein Temperaturoptimum für die Reduktion zwischen 36 und 40°C.

C. Temperaturoptimum der Oxidation

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums der Oxidation wurde die Enzymaktivität zwischen 30 und 60°C gemessen. Der Testansatz enthielt :

5-Hydroxyhexansäureethylester	35 mM
NAD	0,5 mM
Enzymlösung	10 µl
TRIS-HCl-Puffer, 0.1 M, pH 9	

Die KERed aus *C. parapsilosis* hat ein Temperaturoptimum für die Oxidation zwischen 50 und 56°C.

D. Einfluß verschiedener Reagenzien auf die KERed

Der Einfluß der verschiedenen Metallkationen und Reagenzien auf die Enzymaktivität wurde untersucht, indem der unter Beispiel 3.B beschriebene Testansatz verwendet wurde.

Die Ergebnisse der Inhibitionsstudie sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Auffallend ist, daß das Enzym durch den Chelator o-Phenanthrolin relativ stark, durch EDTA hingegen praktisch nicht gehemmt wird. Offenbar besitzt die Ketoester-Reduktase ein essentielles Metallion, das durch o-Phenanthrolin entfernt wird, was wiederum zum Aktivitätsverlust führt. Die zunehmend starke Hemmung der Ketoester-Reduk-

tase durch Thiol-Reagenzien wie N-Ethylmaleimid, Jodoacetamid, 2,2'-Dithio-Bis(2-nitrobenzoat) und p-Hydroxymercuribenzoat weisen darauf hin, daß das Enzym mindestens eine essentielle SH-Gruppe enthält.

Tabelle 3 : Inhibitionsstudie der KERed aus *C. parapsilosis*

Verbindung	Restaktivität [%]	
	0,1 mM	1,0 mM
<u>Metallionen</u>		
Hg ²⁺	0	0
Pb ²⁺	0	0
Ag ⁺	0	0
Cu ²⁺	0	0
Ni ²⁺	10	0
Zn ²⁺	24	0
Sn ²⁺	73	0
Co ²⁺	38	12
Ca ²⁺	78	68
Mn ²⁺	84	80
Mg ²⁺	91	82
Fe ³⁺	100	n.b. ¹⁾
KCN	100	100
<u>Chelatoren</u>		
EDTA (1 mM, 10 mM)	100	80
2,2'-Bipyridyl (0,05 mM; 0,5 mM)	52	23
o-Phenanthrolin	26	n.b.
<u>Sulfhydryl-Reagenzien</u>		
p-Hydroxymercuribenzoat	0	0
5,5'-Dithio-Bis(2-nitrobenzoat)	53	0
Jodoacetamid	77	17,5
N-Ethylmaleimid	70	47
Methylglyoxal	100	34

(Tabelle 3, Fortsetzung)

Sulphydryl-Schutzreagenzien

1,4-Dithiothreitol	100	100
Glutathion (reduziert)	100	100

Histidine-spezifische Reagenzien

Diethyl Pyrocarbonat	100	100
----------------------	-----	-----

Andere Reagenzien

Ethanol (5%)	-	30
Triton X-100 (0.1%)	-	100
Pefabloc (Protease Inhibitor)	n.b.	100

1) n.b. : nicht bestimmt

E. Einfluß der Pufferkonzentration auf die Aktivität der KERed

Der Einfluß der Pufferkonzentration auf die Aktivität der Ketoester-Reduktase wurde getestet. Dazu wurde der in Beispiel 3.B angegebene Testansatz unter Variation der Pufferkonzentration verwendet.

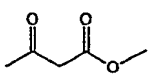
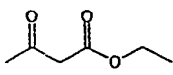
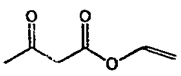
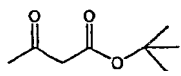
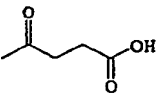
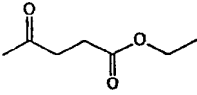
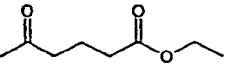
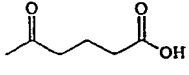
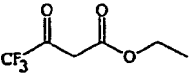
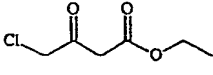
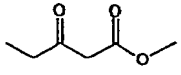
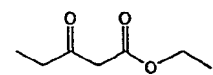
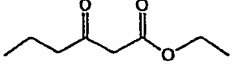
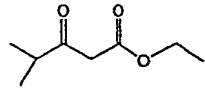
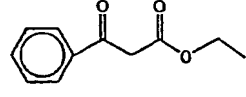
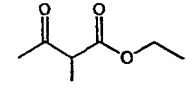
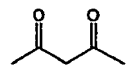
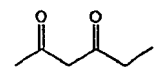
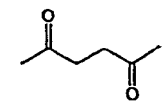
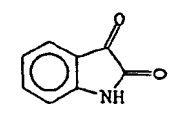
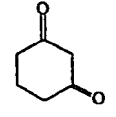
Die Enzymaktivität ist maximal bei einer Molarität des Puffers von 0,1 M.

F. Substratspektrum der KERed

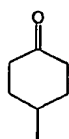
Entsprechend Beispiel 3.B wurde an Stelle von 5-Oxohexansäureethylester eine Reihe aromatischer und aliphatischer Ketoester, Ketosäuren, Ketone, Diketone und Aldehyde daraufhin untersucht, ob sie enzymkatalysiert reduziert werden können. Dabei wurden die Verbindungen stets in 8 mM Endkonzentration zugesetzt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengestellt. Es zeigt sich, daß das Enzym eine Vielzahl aromatischer und aliphatischer Oxoverbindungen als Substrat akzeptiert.

Die Aktivität mit 5-Oxohexansäureethylester wurde willkürlich auf 100% gesetzt.

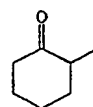
Tabelle 4 : Substratspezifität der KERed aus *C. parapsilosis*

Verbindung	Rel. Aktivität [%]	Verbindung	Rel. Aktivität [%]
<i>Ketosäuren und -ester</i>			
	67		76
	61		137
	0		76
	100		0
	21		92
	18		32
	51		24
	0		70
<i>Diketone</i>			
	15		46
	46		0
	0		

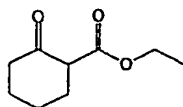
(Tabelle 4, Fortsetzung)

Alicyclische Ketone

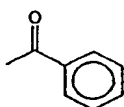
40



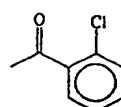
12



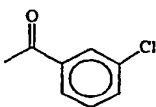
16

Aromatische Ketone

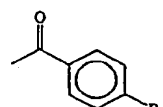
34



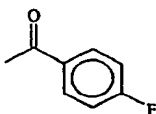
0



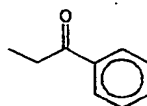
35



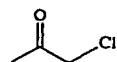
40



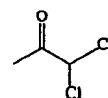
40



0

Aliphatische Ketone

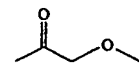
51



60



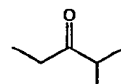
105



53



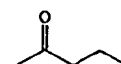
28



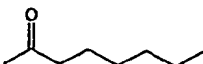
51



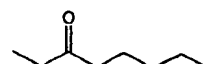
48



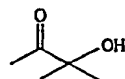
40



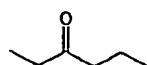
54



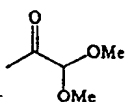
33



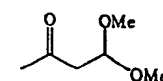
0



4



118

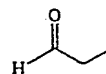


14

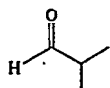
(Tabelle 4, Fortsetzung)

Aliphatische Aldehyde

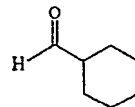
150



127



178



29

α -Ketocarbonsäuren und -ester und Allyl-Ketone werden nicht umgesetzt.

Wie man sieht, ist das Substratspektrum der Ketoester-Reduktase von erheblicher Breite, wobei außer β -, γ - und δ -Ketoestern 1,3- und 1,4-Diketone, ggf. substituierte insbes. halogenierte aliphatische, alicyclische und aromatische Ketone, Ketoacetale und Aldehyde akzeptiert werden.

G. Kinetische Charakterisierung der KERed

Für ausgewählte Substrate wurden mit Hilfe des oben beschriebenen photometrischen Tests ausgewählte Substrate der KERed aus *C. parapsilosis* kinetisch vermessen. Die Ergebnisse der kinetischen Charakterisierung sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5 : Kinetische Charakterisierung der KERed

Nr.	Substrat	V_{\max} (%)	K_m (mM)	V_{\max}/K_m (-)
<i>Aliphatische Ketone</i>				
1	Aceton	97	1,060	5,5
2	Chloroaceton	61	0,124	29,5
3	1.1-Dichloroaceton	45	0,176	15,3
4	Pyruvaldehyd - Dimethylacetal	24	0,189	7,6
5	2-Butanon	100	1,480	4,1
6	3-Chlor-2-Butanon	50	0,442	6,8

(Tabelle 5, Fortsetzung)

7	2-Pentanon	62	0,141	26,4
8	2-Hexanon	53	0,054	58,9
9	3-Hexanon	10	0,840	0,7
10	2-Heptanon	58	0,097	35,9
11	3-Heptanon	11	5,6	0,1
12	4-Heptanon	9	5,3	0,1
13	2-Octanon	62	0,324	11,5
14	3-Octanon	12	11,20	0,1
15	2-Nonanon	45	0,314	8,6
16	2-Decanon	20	3,960	0,3

Aromatische Ketone

17	Acetophenon	22	0,049	26,9
18	3-Chlor-Acetophenon	32	0,015	128,0
19	4-Chlor-Acetophenon	19	0,010	114,0

Aldehyde

20	Acetaldehyd	129	0,085	91,0
----	-------------	-----	-------	------

Ketoester

21	Ethyl 3-oxobutanoat	79	0,122	38,9
22	Tert.-Butyl 3-oxobutanoat	71	0,356	12,0
23	Ethyl 4-Chlor-3-oxobutanoat	10	3,56	0,2
24	Ethyl 4-Trifluor-3-oxobutanoat	11	2,0	0,3
25	Ethyl 3-oxopentanoat	17	6,9	0,1
26	Ethyl 3-oxohexanoat	5	1,3	0,2
27	Ethyl 4-oxopentanoat	12	1,73	0,4
28	Ethyl 5-oxohexanoat	116	0,89	7,8

(Tabelle 5, Fortsetzung)

Primäre und sekundäre Alkohole

29	Methanol	Keine Reaktion		
30	Ethanol	42	3,4	0,7
31	1-Propanol	47	3,8	0,7
32	1-Butanol	47	2,9	1,0
33	2-Propanol	183	2,21	5,0
34	(S)-2-Butanol	210	0,6	21,0

Coenzyme

35	NADH	105	0,038	165,8
36	NADPH	Keine Reaktion		

Alle V_{\max} Werte sind bezogen auf 2-Butanon (6 U/mg, partiell gereinigtes Enzym). Substratinhibition wurde mit Chloroaceton (K_{is} : 121.3 mM), 3-Hexanon (K_{is} : 612 mM) und 2-Nonanon (K_{is} : 24.9 mM) beobachtet. Generell lag der Standardfehler der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten und der Michaelis-Menten-Konstanten zwischen 5-10 Prozent der Werte.

Aus diesen Ergebnissen kann ein Modell für die Substratbindungsstelle der KERed abgeleitet werden. Durch dieses Modell ist eine Vorhersage möglich, ob ein bestimmtes potentiell Substrat von der KERed akzeptiert wird, oder nicht. In Fig. 5 ist das Modell der Substratbindungsstelle dargestellt.

Danach besteht die Substratbindungsstelle aus zwei Bereichen, die sich hinsichtlich Volumen und Hydrophobizität unterscheiden. Die kleine Tasche kann Methyl-, Ethyl- und Propylgruppen aufnehmen. Daneben werden auch substituierte Methylgruppen wie z.B. die Chlormethylgruppe akzeptiert. Die große Tasche kann lange und hydrophobe Reste binden. Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, können dies aliphatische Reste bis C_8 sein (s. 2-Decanon). Die große Tasche kann eine Vielzahl auch sterisch anspruchsvoller Reste aufnehmen und bestimmt maßgeblich das außerordentlich breite Substratspektrum des Enzyms.

H. Enzymkatalysierte Herstellung von 3-Hydroxybuttersäuremethylester im Batch-Ansatz

Eine Lösung von 3-Oxobuttersäuremethylester (100 mM) wurde mit Ketoester-Reduktase (10 U) und Coenzym (0,1 mM) umgesetzt (100 ml Gesamtvolumen), wobei das Coenzym NADH durch Kopplung mit Natriumformiat (1 M) und Formiat-Dehydrogenase (40 U) regeneriert wurde. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie (DC) auf gebildeten 3-Hydroxybuttersäuremethylester analysiert. Die Enantiomerenreinheit wurde über GC-Analyse bestimmt.

Trennbedingungen der DC :

Stationäre Phase : Kieselgel 60 F254
Mobile Phase : Diethylether : Petrolether₆₀₋₈₀ = 2 : 1
Laufstrecke : 5 cm
Tauchlösung : 10%ige Molybdätophosphorsäure-Hydrat-
Lösung in Ethanol (abs) mit 4 % HCl
Verfahren : Aufsteigende Chromatographie bei Kammersättigung
Probevolumen : 2-10 µl
Laufverhalten : Hydroxysäuren/-ester laufen weniger weit als
Ketosäuren/-ester

Nachdem die Reaktionszeit von 36 Stunden abgelaufen war, wurde zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit der Reaktionsansatz mit Chloroform extrahiert, daß ausgefallene Protein abgetrennt und die organische Phase mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) derivatisiert. Eine Probe wurde mittels chiraler Gaschromatographie analysiert.

Trennbedingungen der GC :

Säule : Lipodex E (25m x 0.25 mm ID)
Helium : 0,8 bar
Wasserstoff : 0,5 bar
Probenvolumen : 1 µl

T_{Säule} : 80°C bzw. 90°C

T_{Injektor} : 260°C

Retentionszeiten :

3-(R)-Hydroxybuttersäuremethylester 10,5 min

3-(S)-Hydroxybuttersäuremethylester 14,9 min

Die Elutionsreihenfolge der Enantiomeren auf der chiralen GC-Säule wurde mit reinen Enantiomeren von 3-Hydroxybuttersäuremethylester zu (R) vor (S) bestimmt. Die Ergebnisse der GC-Analyse sind in Fig. 6 dargestellt. Die Ketoester-Reduktase aus *Candida parapsilosis* setzt 3-Oxobuttersäuremethylester mit einem Enantiomerenüberschuß von 98% und einer Ausbeute von 95% zu (S)-3-Hydroxybuttersäuremethylester um.

I. Enzymkatalysierte Herstellung von 5-Hydroxyhexansäureethylester im Batch-Ansatz

Analog zu Beispiel 3.H wurde 5-Oxohexansäureethylester enzymatisch im präparativen Maßstab reduziert. Proben wurde mittels chiraler Gaschromatographie analysiert (T_S: 90°C)

Retentionszeiten :

5-(R)-Hydroxyhexansäureethylester 25,0 min

5-(S)-Hydroxyhexansäureethylester 26,9 min

Die Ergebnisse der GC-Analyse sind in Fig. 7 dargestellt. Die Ketoester-Reduktase aus *Candida parapsilosis* setzt 5-Oxohexansäureethylester mit einem Enantiomerenüberschuß von 95% und einer Ausbeute von 96% zu (S)-5-Hydroxyhexansäureethylester um.

J. Nachweis der Stereospezifität des Enzyms

Zum Nachweis der Stereospezifität des Enzyms und der Enantiomerenreinheit des Produkts wurden zwei Methoden verwendet, einerseits wurde enzymatisch hergestelltes Produkt mit einer chiralen Gaschromatographie, die (*R*)- und (*S*)-Hydroxyester voneinander trennen kann, untersucht, andererseits wurde mit käuflichen, reinen Isomeren von (*R*)- und (*S*)-Hydroxysäureestern sowie (*R*)- und (*S*)-Phenylethanol photometrisch die Oxidationsreaktion gemessen.

1. Chirale GC

Die Produkte der enzymatischen Umsetzungen sowie die käuflichen reinen Enantiomeren wurden mit Hilfe der Gaschromatographie an einer chiralen Phase analog zu Beispiel 3.H getrennt. Die Zuordnung der Peaks erfolgte durch Vergleich mit den käuflichen reinen Enantiomeren von 3-Hydroxybuttersäuremethylester. Die Elutionsreihenfolge (*R*) vor (*S*) gilt für die homologe Reihe der Hydroxyester. Fig. 6 zeigt, daß man durch enzymatische Umsetzung zu reinem (*S*)-Hydroxybuttersäuremethylester gelangt.

2. Rückreaktion mit (*R*)- bzw. (*S*)-Hydroxyverbindungen

Zum photometrischen Nachweis der Stereospezifität wurden folgende Testansätze durchgeführt :

- I) 35 mM (*R*)-Hydroxybuttersäuremethylester
0.5 mM NAD
10 µl Enzymlösung
TRIS-HCl-Puffer, pH 9, 0.1 M
- II) 35 mM (*S*)-Hydroxybuttersäuremethylester
0.5 mM NAD
10 µl Enzymlösung
TRIS-HCl-Puffer, pH 9, 0.1 M
Temperatur : 56°C
- III) 8 mM (*R*)-Phenylethanol
0.5 mM NAD
10 µl Enzymlösung
TRIS-HCl-Puffer, pH 9, 0.1 M
- IV) 8 mM (*S*)-Phenylethanol
0.5 mM NAD
10 µl Enzymlösung
TRIS-HCl-Puffer, pH 9, 0.1 M

Die Aktivitätsmessung erfolgte photometrisch bei 340 nm.

Ergebnisse :

Ansatz I :	7 %	Ansatz II :	100 %
Ansatz III :	1,1 %	Ansatz IV :	100 %

Das Ergebnis zeigt deutlich, daß das Enzym hochspezifisch für (S)-3-Hydroxybuttersäuremethylester und (S)-Phenylethanol ist.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Zur NADH-abhängigen enzymatischen Umsetzung von β -, γ - und δ -Ketoestern zu den entsprechenden optisch aktiven β -, γ - und δ -Hydroxysäureestern befähigte Ketoester-Reduktase, isolierbar aus Stämmen von *Candida parapsilosis*, *Yarrowinia cellobiosa*, *Rhodococcus erythropolis* oder *Pseudomonas acidovorans*.
2. Ketoester-Reduktase nach Anspruch 1, isoliert aus auf längerkettige(s) Alkansäure(n) bzw. Alkan(e) als C-Quelle enthaltendem Medium gezüchteten Stämmen.
3. Ketoester-Reduktase nach Anspruch 1 oder 2, isoliert aus dem *Candida parapsilosis* Stamm DSM 70 125.
4. Ketoester-Reduktase nach einem der vorangehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch folgende Parameter in aufgereinigter Form:
 - ein pH-Optimum für die Ketoester-Reduktion zwischen pH 7,8 und 8,0 und für die Rückreaktion um pH 9,5;
 - ein Temperatur-Optimum zwischen 36 und 40°C für die Reduktion von Ketoestern, und von 50 bis 56°C für die Rückreaktion;
 - rasche Desaktivierung durch Hg^{2+} -, Pb^{2+} -, Ag^{+} -, Cu^{2+} -, Ni^{2+} -, Sn^{2+} - und Co^{2+} -Ionen, starke Inhibierung durch p-Hydroxymercuribenzoat, 5,5'-Dithio-Bis(2-nitrobenzoat) und Jodacetamid sowie durch die Chelatoren 2,2'-Bipyridyl und o-Phenanthrolin und Stabilisierung durch SH-Schutzreagenzien wie Dithiothreitol;
 - zusätzliche Befähigung zur Reduktion von aliphatischen, alicyclischen und aromatischen Ketonen, Diketonen, Ketalen und Aldehyden sowie zur Oxidation von primären und sekundären Alkoholen.
5. Verfahren zur enzymatischen Reduktion von Oxo-Verbindungen unter Bildung optisch aktiver S-Hydroxyverbindungen, dadurch gekennzeichnet, daß man die Oxo-Verbindung in Gegenwart von NADH mit Hilfe von Ketoester-Reduktase nach einem der Ansprüche 1 - 4 umsetzt.

6. Verfahren zur Herstellung optisch aktiver R-Hydroxy-Verbindungen durch eine enzymatische Oxidation mit Ketoester-Reduktase nach einem der Ansprüche 1 - 4,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man von einem Racemat von R- und S-Hydroxy-Verbindungen ausgeht und das S-Enantiomere enzymatisch in die Oxo-Verbindung überführt und abtrennt.
7. Verfahren zur Gewinnung von Ketoester-Reduktase mit Befähigung zur NADH-abhängigen enzymatischen Umsetzung von β -, γ - und δ -Ketoestern zu den entsprechenden optisch aktiven β -, γ - und δ -Hydroxysäureestern,
g e k e n n z e i c h n e t d u r c h ,
Kultivierung von Stämmen von *Candida parapsilosis*, *Yarrowinia cellobiosa*, *Rhodococcus erythropolis* oder *Pseudomonas acidovorans* und Isolierung des von den Mikroorganismen gebildeten Enzyms aus dem Zell-Rohextrakt durch fraktionierte PEG-Fällung.
8. Verfahren nach Anspruch 7,
g e k e n n z e i c h n e t d u r c h
nachfolgende chromatographische Auftrennung zur weiteren Aufreinigung des Enzyms.

1 / 7

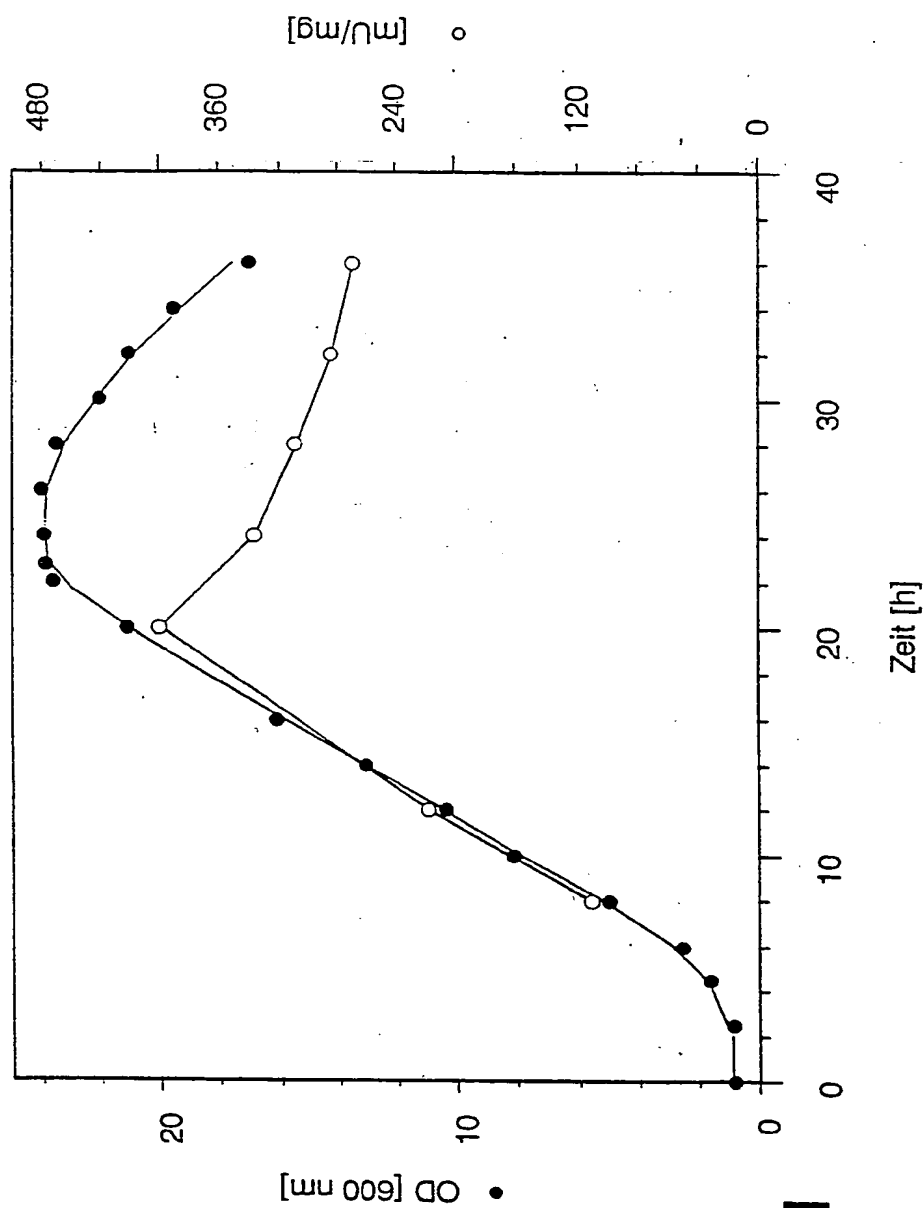


Fig. 1

2 / 7

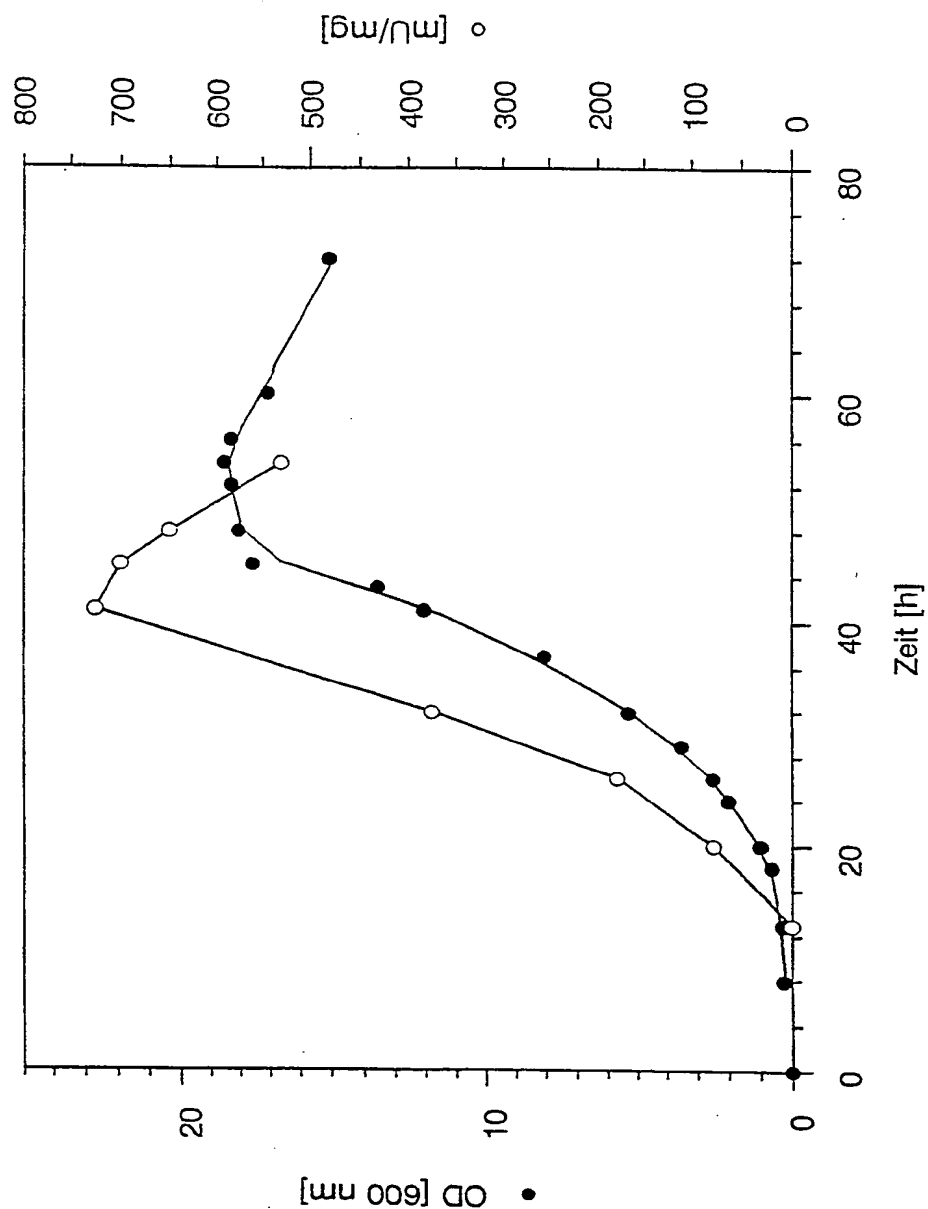


Fig. 2

3 / 7

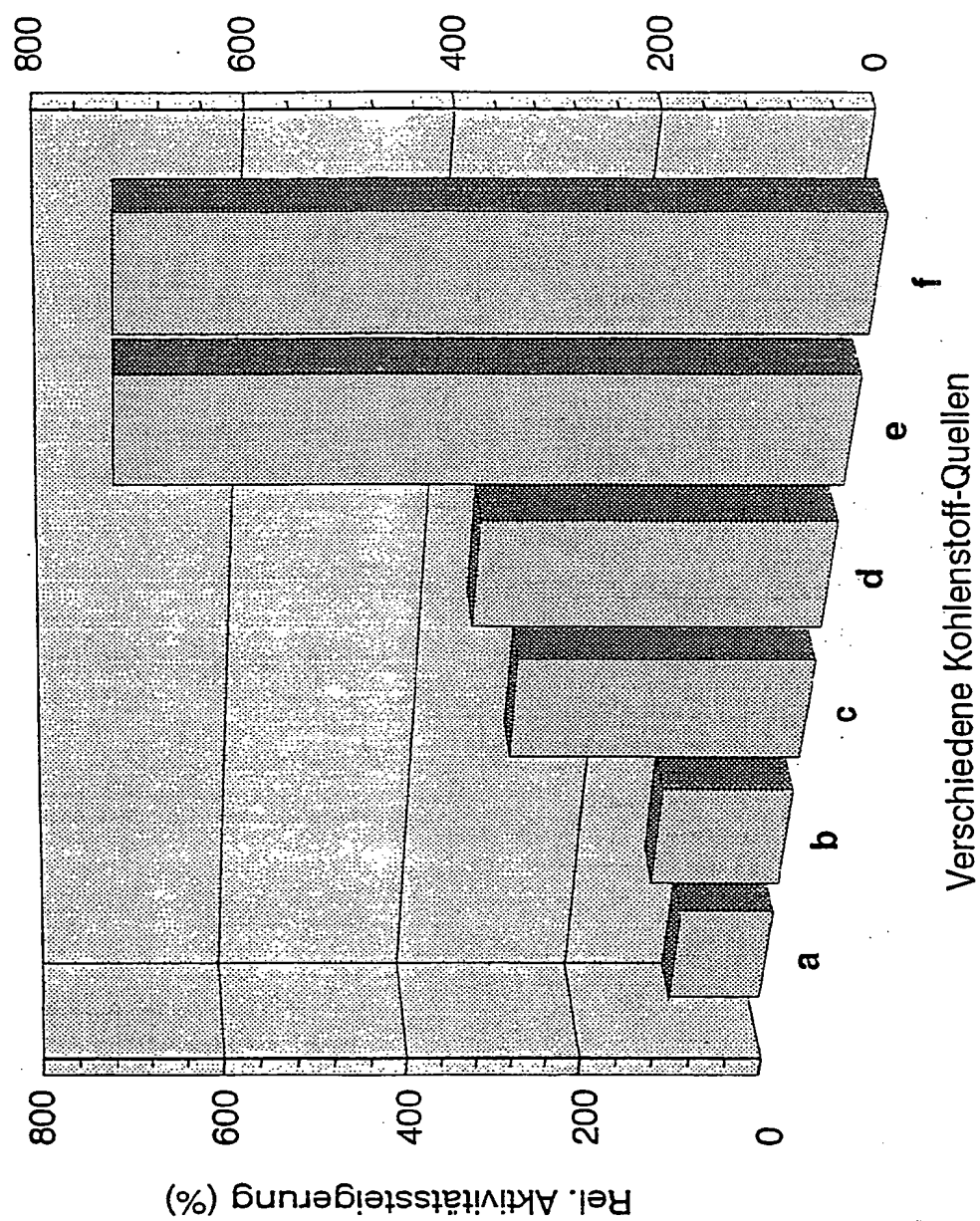
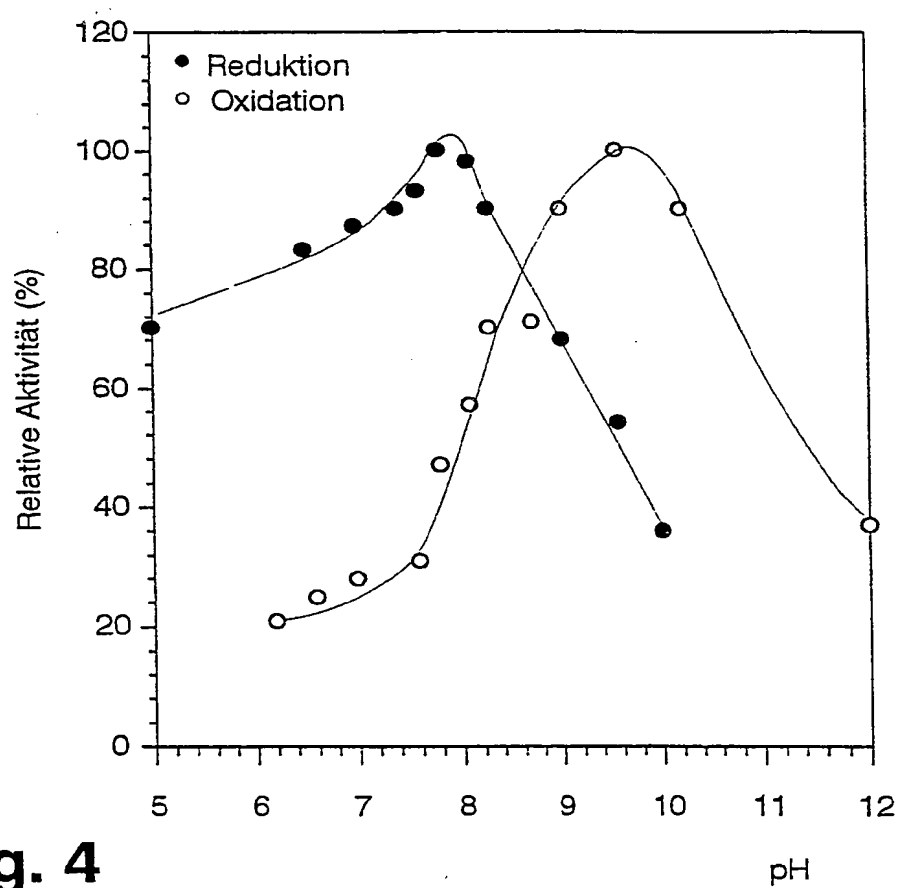


Fig. 3

4 / 7

**Fig. 4**

5 / 7

Große Tasche

Kleine Tasche

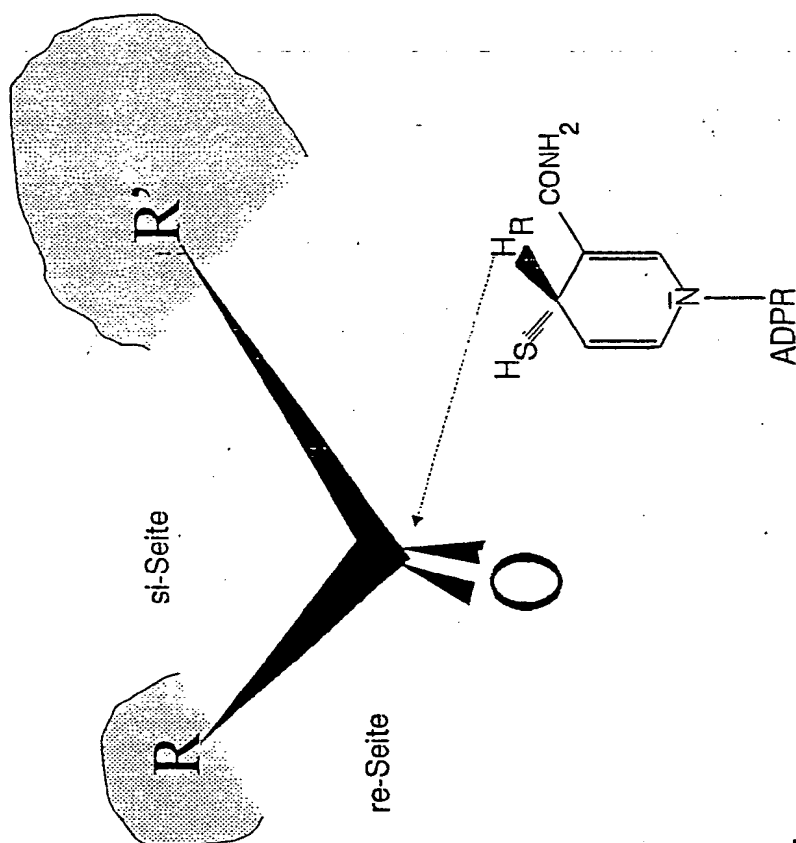


Fig. 5

6 / 7

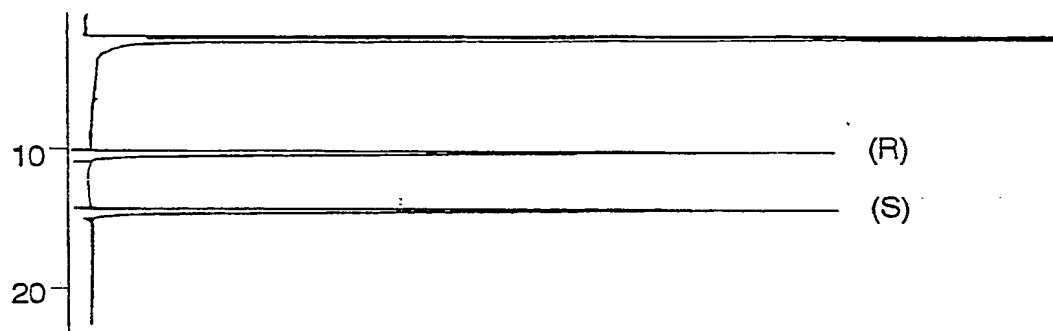


Fig. 6a

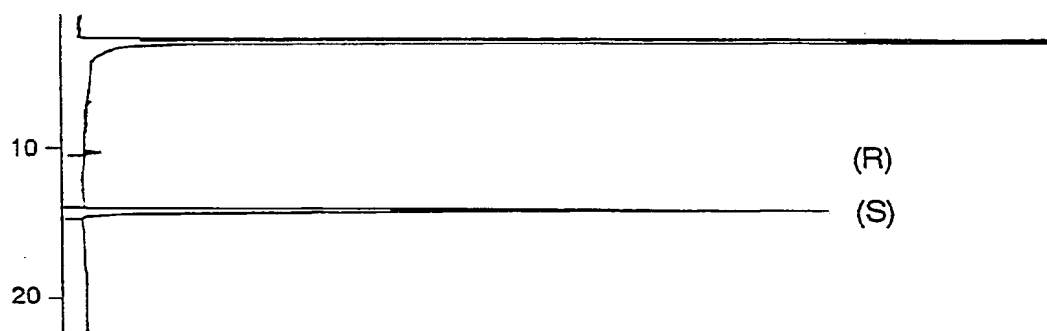


Fig. 6b

7 / 7

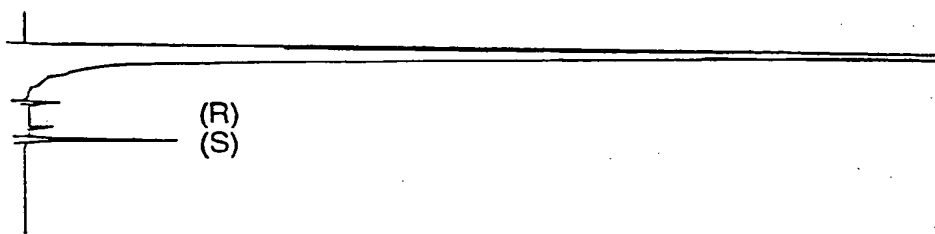


Fig. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 93/00198

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. 5 C12N 9/02, C12P 7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. 5 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, BIOSIS, WPI, CLAIMS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Dialog Information Services, File 155, Medline, Dialog accession No.02804302, Medline accession No. 75211302, Utting JM et al: "Structural, kinetic, and renaturation properties of an induced hydroxy-pyruvate reductase from Pseudomonas acidovorans", J Biol Chem Jul 10 1975, 250 (13) p5233-42 --	1-8
P,X	Dialog Information Services, File 5, BIOSIS, Dialog accession No. 10061149, BIOSIS accession No. 95061149, PETERS J et al: "STUDIES ON THE DISTRIBUTION AND REGULATION OF MICROBIAL KETO ESTER REDUCTASES", APPL MICROBIOL BIOTECHNOL 38 (3), 1992, 334-340 -----	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 June 1993 (28.06.93)

Date of mailing of the international search report

21 July 1993 (21.07.93)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 93/00198

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPC5: C12N 9/02, C12P 7/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPC5: C12N

Recherche, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

MEDLINE, BIOSIS, WPI, CLAIMS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	Dialog Information Services, File 155, Medline, Dialog accession no 02804302, Medline accession no. 75211302, Utting JM et al: "Structural, kinetic, and renaturation properties of an induced hydroxy-pyruvate reductase from Pseudomonas acidovorans", J Biol Chem Jul 10 1975, 250 (13) p5233-42 --	1-8
P,X	Dialog Information Services, File 5, BIOSIS, Dialog accession no. 10061149, BIOSIS accession no. 95061149, PETERS J et al: "STUDIES ON THE DISTRIBUTION AND REGULATION OF MICROBIAL KETO ESTER REDUCTASES", APPL MICROBIOL BIOTECHNOL 38 (3), 1992, 334-340 -- -----	1-8

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen.

☐ Siehe Anhang Patentfamilie.

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

- * "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- * "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- * "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- * "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- * "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

* "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

* "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

* "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28 Juni 1993

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

21. 07. 93

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

JONNY BRUN

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)